



Artículo Original

Comparación de antígenos de excreción-secreción de epimastigotes (ESEA) y tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* mediante Western blot para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Comparison of *Trypanosoma cruzi*-epimastigotes (ESEA) and trypomastigotes (TESA) excretory-secretory antigens by Western blotting technique for Chagas' disease diagnosis

Ana Vásquez Tandaypán¹, Hermes Escalante² y Adderly Benites¹

¹Egresado, Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* y se presenta como una enfermedad de naturaleza crónica cuyo diagnóstico serológico depende la calidad del antígeno. En la presente investigación se comparó el número, peso molecular y reactividad antigénica mediante Electroinmunotransferencia "Western Blot", usando pooles de sueros positivos a la enfermedad de Chagas, de antígenos de excreción-secreción de epimastigotas (ESEA) y tripomastigotes (TESA) de *T. cruzi* cepa "C₄" proveniente del departamento de Arequipa (Perú). Para ello, los epimastigotas fueron incubados en medio Bifásico (agar BHI-sangre/PYLB) por 15 días, a temperatura ambiente, y luego de en Minimum Essential Medium (MEM) para obtener los antígenos ESEA; los TESA, por su parte, se obtuvieron del mismo modo que para los ESEA, incluyendo una fase de transformación denominada Metacicloogénesis. La concentración de las proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford. Mediante "Western Blot", finalmente, se determinó los perfiles antigénicos de los ESEA y de los TESA de la cepa "C₄" registrando 22 bandas y 23 bandas, respectivamente, comprendidas en un rango de 100 a 10 kDa para cada una de ellas. Se concluye que existe mayor reactividad antigénica para los TESA, además de la presencia de una banda de 18 kDa de los TESA en relación a los ESEA, al comparar los antígenos de excreción-secreción de epimastigotas (ESEA) y tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* cepa "C₄", evaluadas mediante Electroinmunotransferencia.

Palabras clave: antígenos ESEA, antígenos TESA, *Trypanosoma cruzi*, Western blot.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, it is presented as a disease of chronic nature, and its efficient serologic diagnosis depends on the quality of the antigen. In this research the number, molecular weight and antigen reactivity was compared using electroblotted "Western Blot" using pools of sera positive for Chagas disease antigens epimastigotes excretory-secretory (ESEA) and trypomastigotes (TESA) *T. cruzi* strain "C₄" from the department of Arequipa (Peru). To this end, epimastigotes were incubated in biphasic medium (BHI-agar blood / PYLB) for 15 days at room temperature, and then in Minimum Essential Medium (MEM) for the ESEA antigens abstention; TESA, on the other hand, were obtained in the same manner as for ESEA, including a transformation phase called metacyclogenesis. The protein concentration was determined by Bradford's colorimetric method. By "Western blotting", finally, the antigenic profiles of ESEA and TESA strain "C₄" presented 22 and 23 bands, respectively, included in a range from 100 to 10 kDa for each was determined. It was concluded that TESA presented more antigenic reactivity than ESEA, besides the presence of a band of 18 kDa only in TESA, comparing the excretory-secretory antigens of epimastigotes (ESEA) and trypomastigotes (TESA) of *Trypanosoma cruzi* strain "C₄", assessed by electroblotted.

Keywords: ESEA-antigens, TESA-antigens, *Trypanosoma cruzi*, Western blotting

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas en el hombre, protozoonosis metaxénica causada por el flagelado *Trypanosoma cruzi*, es una endemia en muchos países de América donde afecta a aproximadamente nueve millones y otros 90 millones se hallan en riesgo de infección, principalmente en lugares donde han sido detectados los vectores: miembros de la subfamilia Triatominae, en particular aquellos de hábitat intra domiciliario, como es el caso de *Triatoma*^{1,2,3}. En el Perú, los departamentos en que se han registrado casos autóctonos de enfermedad de Chagas son: Piura, Cajamarca, Amazonas, Apurímac, San Martín, Junín, Ucayali, Huánuco, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna⁴.

En la fase aguda de la enfermedad se observa elevada parasitemia, presencia de anticuerpos no específicos y el inicio de la formación de anticuerpos específicos (IgG e IgM); en la fase crónica, la parasitemia es baja y la presencia de anticuerpos específicos prevalece, entonces, se recomienda para el diagnóstico el uso de técnicas serológicas^{6,7}. Se han utilizado varias de estas técnicas, dentro de las que destacan la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Inmunoensayo Enzimático o prueba de ELISA, las cuales presentan sensibilidad y especificidad variables, aspecto que está relacionado con el tipo de antígeno utilizado⁶.

Desde que la técnica de Western blot fue adaptada para el diagnóstico de enfermedades parasitarias, muchas de ellas, incluyendo la enfermedad de Chagas, fueron incluidas en las investigaciones para su estandarización y posterior aplicación como técnica de confirmación, considerando que durante su desarrollo se fracciona mediante electroforesis a los antígenos (aspecto que le da una especificidad por encima del 95%) y luego estas fracciones, por separado, se detectan mediante una ELISA (aspecto que le da eventualmente el 100% de sensibilidad)^{8,9,10}. En este contexto, desde la década de los 90s se han efectuado investigaciones relacionadas con el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, mediante la técnica de Western blot, utilizando mayormente antígenos de excreción-secreción, debido a que hay concordancia que por su elevada especificidad resultan ser más sensibles que otros tipos de antígenos y han sido usados para el seguimiento de pacientes chagásicos crónicos^{8,9,11} y el diagnóstico de la parasitosis en humanos y animales de zonas endémicas^{12,13,14,15,16}.

En las mencionadas investigaciones se ha usado, en algunos casos, los antígenos de excreción-secreción de los epimastigotas (ESEA) y en otros de los tripomastigotas (TESA); sin embargo, debe tenerse en cuenta que la dificultad, rapidez y gastos es diferente para obtener el uno o el otro tipo. En efecto, los ESEA se obtienen con mayor facilidad, en menor tiempo y en mayores cantidades que los TESA; por el contrario, los TESA, por ser obtenidos de las formas infectantes, resultan ser más útiles. En el presente informe se presentan los resultados de una investigación dirigida a comparar a los ESEA y TESA de la cepa “C₄” de *Trypanosoma cruzi*, proveniente del departamento de Arequipa (Perú), en relación al número, peso molecular y reactividad antigénica, mediante la técnica de Western Blot usando pool de sueros positivos a *T. cruzi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizó la cepa C₄ de *T. cruzi* proveniente del Valle de Vitor (Arequipa) que es una zona endémica, proporcionada por el Centro de Análisis e Investigación ESCALABS; esta cepa fue aislada de las heces de *Triatoma infestans*, la cual fue cultivada en medio bifásico (agar BHI-sangre/PYLB). También se utilizó 20 Sueros positivos a la Enfermedad de Chagas procedentes del Instituto Nacional de Salud y proporcionadas por el Centro de Análisis e Investigación ESCALABS.

Propagación de epimastigotas^{15,16,18}

Las formas epimastigotas de la cepa de *T. cruzi*, fueron cultivadas en tubos estériles de 20x150mm con tapa rosca, conteniendo 8mL de un medio Bifásico (Agar BHI y medio PYLB) suplementado con 10% de sangre desfibrinada de conejo⁴¹, y 0.01% de Amikacina (500mg/2mL), por periodos de 15 días a temperatura ambiente (entre 20° a 25°C)^{42,43}.

Se utilizó un inóculo inicial de aproximadamente 5 x 10⁵ parásitos que fue monitoreados por recuento en cámara de Neubauer a los 10 días, extrayendo una gota del cultivo, colocándola entre lámina y laminilla para observar al microscopio con objetivo de 40X. Cuando el cultivo se encontró en su fase logarítmica final (entre 10 a 15 días de incubación), se procedió a la cosecha bajo condiciones

de esterilidad, por centrifugación del medio líquido a 4000 rpm/5 min y se lavó 3 veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) estéril más antibiótico (0.5% Bencilpenicilina 10⁶UI/5mL y 0.25% Gentamicina 160mg/2mL), para eliminar los residuos del medio, realizando por cada lavada centrifugaciones a razón de 4000 rpm/5 min.

Metaciogénesis In vitro^{15,17}

A partir de un lote, luego de la cosecha y lavado respectivo, los epimastigotas fueron transferidos al medio de transformación Grace's Insect Medium SIGMA®, pero previamente fueron sometidos a un cuarto lavado con el medio a experimentar de la misma manera que el primer lavado y además fueron evaluados por recuento en cámara de Neubauer, extrayendo una gota de la suspensión. Finalmente, se acondicionó 5 tubos de 13x100mm provistos con tapones de jebes, para repartir equitativamente el volumen de pellet obtenido y añadirle Grace's Insect Medium en proporción 1:3, también se suplementó el medio con Suero Bovino Fetal al 20% y aditivado con antibióticos Bencilpenicilina sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Gentamicina 160mg (0.25mL/100mL). Los tubos resultantes fueron dejados a temperatura ambiente y en cámara oscura durante 7 días o 140 horas. Transcurrido este periodo se realizó la evaluación del cultivo, por recuento en cámara de Neubauer, extrayendo una gota del cultivo. La muestra tomada se utilizó además para realizar coloración Wright para confirmar la existencia de tripomastigotas.

Obtención de ESEA¹⁶

Para la obtención de los ESEA, los epimastigotes propagados se resuspendió en Buffer Fosfato Salino (PBS) estéril más antibiótico (0.5% Bencilpenicilina 10⁶UI/5mL y 0.25% Gentamicina 160mg/2mL) ajustando a una concentración de 1 x 10⁶ epimastigotes/mL en cámara de Neubauer (40X), luego se cultivó 1 mL de esta suspensión en 3mL de Minimum Essential Medium (MEM) más antibiótico (0.5% Bencilpenicilina 10⁶UI/5mL y 0.25% Gentamicina 160mg/2mL), el cual se incubó a 37°C por 20 horas, posteriormente se centrifugó a 4000rpm/5min el cultivo, y el sobrenadante constituido por el medio y los ESEA serán guardados a -20°C en tubos Eppendorf hasta su uso.

Obtención de TESA¹⁵

Después de 7 días se centrifugó el medio Grace's Insect a 4000 rpm por 5 min, se extrajo los sobrenadantes y se eliminó. Posteriormente para depurar residuos del medio anterior, los tripomastigotas fueron lavados en PBS estéril una vez y luego en Minimum Essential Medium Eagle SIGMA® (MEM), y centrifugados a 4000 rpm por 5 min, para finalmente ser dejados en nuevos tubos de 13x100mm provistos con tapones de jebes, con Minimum Essential Medium Eagle (MEM) en proporción 1:3 y aditivado con Bencilpenicilina sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Gentamicina 160 mg (0.25mL/100mL), a 37°C durante 20 horas. Luego de 12 horas de incubación, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 5 min, para separar los antígenos de excreción/secreción presentes en el sobrenadante, los cuales fueron almacenados en tubos Eppendorf a -20°C hasta su uso.

La técnica de "Western Blot"²⁰

Se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual de V. Tang. Las particularidades en cada fase fueron:

• Tratamiento y preparación de ESEA y TESA

Se usaron concentraciones de 0.025 y 0.050 ug/uL, tratados con dithiothreitol (DTT), 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 6% de glicerol, 0.01M tris-HCl pH 8 y 0.025% de azul de bromofenol. Se calentó a 65°C por 20 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se guardó a -20°C. Previamente, se midieron las proteínas presentes utilizando el método colorimétrico de Bradford¹⁹.

• Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se colocó en los pocillos en una cantidad equivalente a 1uL por cada milímetro de ancho del gel. Los corridos se realizó en mini geles de 7.5 x 6.0 x 0.3 mm, 15% del gel separador de poliacrilamida y 3% del gel concentrador, con 2% de persulfato de sodio y TEMED (tetrametilendiamina). La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA y 60V para el gel concentrador y 50 mA y 200V para el gel separador, hasta que el colorante trazador alcanzó el extremo inferior de cada uno de los geles.

• Transferencia de proteínas

Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (Trans Blot Cell, Bio Rad), los geles fueron previamente lavados utilizando un buffer de transferencia (constituido por 0.2 Tris-HCl pH 9.18, 20% de metanol y agua destilada), para remover el SDS. La transferencia se realizó a 2A y 100V por espacio de 2 horas y a -20°C, los papeles de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se lavó por

cuatro veces con PBS/Tween-20 (0.1M NaCl; 0.05M Na₂PO₄, pH 7.2 y 0.3% Tween-20) y dos veces con PBS solo, en agitación constante; luego fueron cortadas en tiras de 5mm de ancho en forma perpendicular al eje de migración de la electroforesis para finalmente ser guardados de 2°C a 8°C.

• **Revelado enzimático de los ESEA y TESA**

Las tiras de nitrocelulosa fueron incubadas con las muestras de sueros positivos a la enfermedad de Chagas, las cuales estuvieron diluidas 1/20 en PBS/Tween-20 y leche descremada a la dilución de 5%. El volumen de la muestra por canal de placa de incubación fue de 0.5mL. Se incubó las tiras en agitación constante y a temperatura ambiente por una hora, luego se realizó tres lavados con PBS/Tween-20, a temperatura ambiente por cinco minutos en agitación constante. Posteriormente, se adicionó 0.5mL de conjugado enzimático por tira, a la dilución de 1/1200 en PBS/Tween-20, los cuales se mantuvieron en agitación constante por una hora, luego se realizó tres nuevos lavados con PBS/Tween-20 y dos lavados con PBS sólo, por 5 minutos cada lavado a temperatura ambiente agitándose constantemente. Para revelar las bandas antigénicas se adicionó 500 uL de la solución de sustrato (H₂O₂ AL 0.01% y diaminobenzidamina a la concentración de 0.5 mg/mL y 10mL de PBS) y se incubó por 10 minutos; deteniéndose la reacción adicionando agua destilada por 10 minutos.

• **Determinación de los pesos moleculares de cada una de las bandas antigénicas de los ESEA y TESA.**

Se realizó por comparación con las bandas de las proteínas del marcador de bajo peso molecular (Low Range, Ewigh Estándar; Bio Rad), el cual incluye las siguientes proteínas: fosforilasa b (97.4 kDa), albumina sérica (66.2 kDa), ovo albumina (45.0 kDa), anhidrasa carbónica (31.0 kDa), inhibidor de la tripsina (21.5 kDa) y lizosima (14.4 kDa); las cuales permitió determinar el peso molecular de cada uno de los componentes antigénicos mediante la determinación de la movilidad relativa (Rf) de las bandas de las proteínas del marcador y de la tira problema.

RESULTADOS

Se registró un total de 22 bandas antigénicas para los ESEA y 23 bandas antigénicas para los TESA, comprendidas en un rango de 100 a 10 kDa (Fig. 1)

A través del análisis comparativo de los perfiles antigénicos de dichas cepas, se estableció el número de antígenos (número de bandas), peso molecular y reactividad antigénica (intensidad de banda) de los ESEA y TESA, donde se observó un predominio en la intensidad de las bandas en el perfil antigénico de los TESA en comparación de los ESEA, además de la presencia de una banda de 18kDa (Fig. 2).

DISCUSIÓN

Muchos de los trabajos realizados con respecto al estudio de antígenos de *T. cruzi* para ser usados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas están basados en describir y comparar los antígenos extraídos de extractos totales del parásito, antígenos recombinantes, antígenos de excreción/secreción de tripomastigotas (TESA), entre otros, los cuales implican recursos que países en vías de desarrollo no podrían cubrir, por lo cual se ve la necesidad de buscar métodos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas al alcance de tales países^{11,13}.

Por ello y hasta donde se sabe, son pocos los estudios que se realizan empleando antígenos de Excreción/Secreción de epimastigotas (ESEA) de *T. cruzi* los cuales son simples y baratos de producir, además de obtener un alto rendimiento en su producción, mostrando excelente sensibilidad y una especificidad aceptable¹⁶.

Otro de los problemas es que, además de ser pocos los estudios con respecto a los ESEA y TESA, solo existe un estudio donde se compare antigénicos de ESEA y de TESA de *T. cruzi*²¹, por ello el presente trabajo comparó los perfiles antigénicos de los ESEA y TESA de *T. cruzi* "C₄" proveniente de Arequipa, el cual es zona endémica de la enfermedad de Chagas.

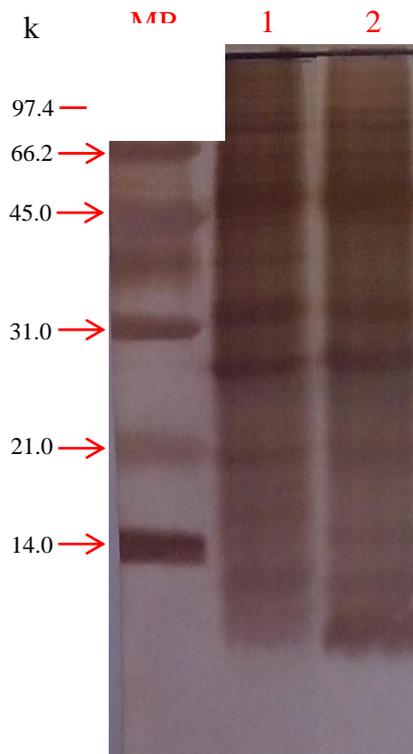


Fig. 1.- Antígenos de excreción/secreción de epimastigotas (ESEA) y tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* cepa “C4” proveniente de Arequipa, reconocidos por Western Blot usando un pool de sueros positivos a la enfermedad de Chagas. El carril 1 represente los ESEA, el carril 2 representa los TESA y el carril MPM (Marcador de Peso Molecular) representa los marcadores de bajo peso molecular en kDa: fosforilasa b (97.4), albumina sérica (66.2), ovo albumina (45.0), anhidrasa carbónica (31.0), inhibidor de la tripsina (21.5) y lizosima (14.4).

En investigaciones previas se ha descrito la capacidad antigénica de los ESEA, reportando bandas antigénicas comprendidas en el rango de 220 a 20 kDa que son secretadas y excretadas por las formas epimastigotas de *T. cruzi* en el sobrenadante de los medios axénicos^{15,16,18}.

En la evaluación del perfil antigénico de los ESEA, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, usando pool de sueros positivos a la enfermedad de Chagas, revelaron la presencia de 22 componentes antigénicos, en un rango de peso molecular comprendido entre 100 a 10 kDa. En este mismo rango se evaluó el perfil antigénico de los TESA, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, usando pool de sueros positivos a la enfermedad de Chagas, donde revelaron la presencia de 23 componentes antigénicos (Fig. 1). Sin embargo se han reportado amplios rangos y diferente número de bandas por perfil; para antígenos totales de tripomastigotes desde 116 KDa a 45KDa, 21 bandas totales, estudiadas en México, y para antígenos E/S purificados de tripomastigotes desde 220 KDa a 20 KDa; en Canadá^{9,13,14}.

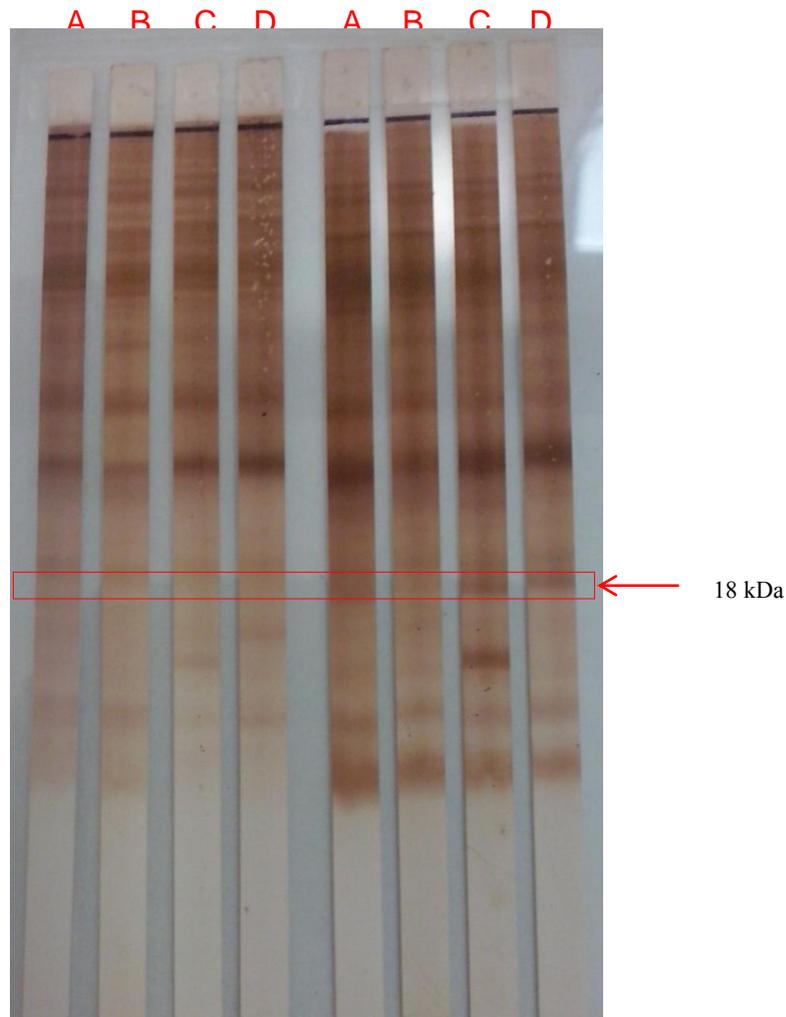


Fig. 2.- Análisis comparativo de los Antígenos de excreción/secreción de epimastigotas (ESEA) y tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* cepa “C4” proveniente de Arequipa, reconocidos por Western Blot enfrentados con pool de sueros positivos a la enfermedad de Chagas, donde el pool 1 (A y A’), pool 2 (B y B’), pool 3 (C y C’) y pool 4 (D y D’). Los carriles A, B, C y D corresponden a los ESEA y los carriles A’, B’, C’ y D’ corresponden a los TESA.

Se encontraron 23 bandas de 10, 12, 13.8, 14.7, 18.0, 19.2, 20.1, 22.9, 25.0, 26.0, 30.0, 31.6, 33.0, 34.0, 36.0, 39.8, 42.3, 46.3, 57.7, 69.4, 76.1, 90.8, 97.4 kDa; para antígenos TESA, comprendidas en un rango de 100 a 10 kDa. Siendo la banda de 18.0 kDa, particular de tripomastigotes; además se evidenció mayor reactividad antigénica en los TESA de bajo peso molecular, al revelarse las bandas con mayor intensidad (Fig. 2 y Tabla 1).

La banda de 18 kDa puede deberse a antígenos somáticos de los tripomastigotes que se liberan al medio extracelular como antígenos de excreción-secreción, además esta banda cruza con sueros de pacientes con Leishmaniosis¹³. Aunque se encontraron pequeñas diferencias en pesos moleculares de antígenos al ser comparado el método utilizado en este trabajo con otros estudios, que comparten la misma fuente de antígenos (TESA) y condiciones electroforética similares; se confirma un similar patrón de reactividad ante sueros de pacientes chagásicos.

Tabla 1.- Análisis comparativo en relación al número de antígenos (número de bandas), peso molecular y reactividad antigénica (intensidad de banda) del perfil antigénico de los antígenos de excreción/secreción de epimastigotas (ESEA) y tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* cepa “C₄” proveniente de Arequipa, reconocidas por Western Blot usando pools de sueros positivos a la enfermedad de Chagas.

PM (kDa)	ESEA	TESA
97.4	+	+
90.8	+	+
76.1	+	+
69.4	+	+
57.7	+	+
46.3	+	+
42.3	+	+
39.8	+	+
36	+	+
34	+	+
33	+	+
31.6	+	+
30	+	++
26	+	++
25	+	++
22.9	+	++
20.1	+	++
19.2	+	++
18	0	+
14.7	+	++
13.8	+	++
12	+	++
10	+	++

Varios criterios de positividad se han utilizado para detectar la enfermedad de Chagas usando la técnica de Electroinmunotransferencia. Por ejemplo, el reconocimiento de suero de al menos 3 bandas de un grupo de 7 bandas (14, 19, 27, 30, 34, 37, 75 kDa) o al menos 5 bandas de un conjunto de 10 (25, 30, 33, 37, 39, 45, 52, 70, 75 y 92 kDa). Dichas variaciones pueden deberse a las diferencias en la cantidad de antígeno que se produce por cada cepa estudiada y la naturaleza proteica de cada antígeno^{12,13,16}.

Para esclarecer estas diferencias se requiere utilizar anticuerpos monoclonales contra antígenos selectivos del parásito, como se viene realizando para antígenos somáticos^{10,13,17,21}.

A través del presente estudio fue posible incrementar el conocimiento que se tiene en la relación a la composición antigénica de los ESEA de *T. cruzi* cepa “C₄” procedente de nuestro país. Es importante hacer notar, la presencia de componentes antigénicos aun no reportados en los trabajos citados. La diferencia en la reactividad serológica entre una especie y otra reportados representan una ventaja en estudios de caracterización de antígenos y especialmente en el desarrollo de técnicas inmunodiagnósticas.

Los resultados obtenidos proporcionan la base para seguir realizando estudios complementarios donde se evalúe sueros individuales de pacientes con la enfermedad de Chagas y de otras parasitosis con el objetivo de determinar antígenos específicos para *T. cruzi* y ser utilizados en técnicas inmunodiagnósticas, por lo que se concluye que los perfiles antigénicos de los antígenos de excreción/secreción de epimastigotas (ESEA) y tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* cepa “C₄” presentaron 22 bandas y 23 bandas respectivamente en un rango de 100 kDa a 10kDa y que, al comparar los antígenos de Excreción/Secreción de epimastigotas (ESEA) y tripomastigotes (TESA)

de *Trypanosoma cruzi* cepa "C₄", evaluadas mediante Electroinmunotransferencia, evidenció mayor reactividad antigénica para los TESA, además de la presencia de una banda de 18 kDa de los TESA en relación a los ESEA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am College Cardiol* 2013; 62(9): 767-776
2. Rodrigues Coura J. Chagas disease: control, elimination and eradication. It is possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108(8): 962-967
3. Tyler K, Engman D. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 131:472-481.
4. Hunter GC, Borrini-Moyon K, Ancca Juarez J, Castillo Neyra R, Verástegui MR, et al. A field trial of alternative targeted screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(1): e1468
5. Gomes YM, Lorena VMB, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: wath as been achieved? Wath remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (Suppl. 1): 115-121
6. Riera C, Verges M, Iniesta L, Gállego M, Tebar S, Portús M. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med and Hyg* 2012; 86(3): 412-416.
7. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, et al. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigote, fixed-trypomastigote or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfusion Med* 2006; 16(6): 419-431.
8. Juri D, Venegas F. 1995. Antígenos excretados y secretados para seguimiento de pacientes chagásicos crónicos tratados con Itraconazol. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). Santiago de Chile. Fondecyt Regular 1931043 año 1993. Pp.76-80.
9. Nakasawa M, Rosa DS, Pereira VRA, Moura MO, Furtado VC, et al. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* potentially useful for srodiagnosis of chronic Chagas disease. *Clin and Diag La Immunol* 2001; 8(5): 1024-1027
10. Gomes Sila A, Silveira Lacerda EP, Cunha-Junior JP, Aparecida daSousa M, Favoreto Junior S. Immunoblotting analysis using two-dimensional gel electrophopresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens. *Ver Soc Bras Med Trop* 2004; 37(6): 454-459 (150-160 KDa)
11. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk K, Ache A, et al. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 291-296
12. Zarate-Blades CR, Bladés N, Nascimento MS, Franco da Silveira J, Uemazawa ES. Diagnostic performance of tets based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area of Chagas disease in Bolivia. *Diag Microb and Infect Dis* 2007; 57: 229-232
13. Umezawa ES, Souza AI, Pinedo-Cancino V, Marcondes M, Marcili A, et al. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica* 2009; 111: 15-20
14. Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodríguez J, Jorquera A, Figuera MA, et al. Development and Application of an ELISA Assay Using Excretion/Secretion Proteins from Epimastigote Forms of *T. cruzi* (ESEA Antigens) for the Diagnosis of Chagas Disease. *J Trop Med* 2012; ID 875909.
15. Escalante H, Jara C, Espinoza R. Antígenos de excreción secreción de tripopmastigotas de *Trypanosoma cruzi* detectados por Western blot usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada. *REBIOL* 2013; 33(2): 67-75
16. Escalante H, Jara C, Davelois K, Iglesias M, Benites A, Epinoza R. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Med Peru Med Exp Salud Pública* 2014; 31(4): 644-651
17. De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Graterol D, Contreras V. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud* 2007; 11(2):39-47.
18. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de chagas). 2ªEdición. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Lima – Perú. Serie de Normas Técnicas N° 26. 2005. p. 106
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

20. Tsang V, Hancock K, Wilson M. Enzymen-linkend immunoelectrotransfer Blot Technique (Western Blot) for Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-associated Virus (HTLV-III/LAV) Antibodies. Atlanta: U. S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1986.
21. Frade AF, Luquetti AO, Prata A, Ferreira AW. Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years old in Brazil. Acta Tropica 2011; 117: 10-13

Correspondencia:
Hermes Escalante Añorga. hescalante@unitru.edu.pe